

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-322621

(43)Date of publication of application : 24.11.1999

(51)Int.Cl. A61K 35/74
A61K 31/00
A61K 31/00

(21)Application number : 10-352873

(71)Applicant : CAVALIERE VED VESELY RENATA
MARIA ANNA
DE SIMONE CLAUDIO

(22)Date of filing : 11.12.1998

(72)Inventor : CAVALIERE VED VESELY RENATA
MARIA ANNA
DE SIMONE CLAUDIO

(30)Priority

Priority number : 98 98830264 Priority date : 30.04.1998 Priority country : EP

(54) PHARMACOLOGICAL COMPOSITION FOR TREATING VAGINAL INFECTIOUS DISEASE,
CONTAINING BACTERIA OF LACTIC ACID BACILLUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a pharmacological composition based on a *Lactobacillus brevis* suitable for effectively treating vaginal infectious diseases (e.g. vaginitis and colpopathy).
SOLUTION: A *Lactobacillus brevis* is used for producing a pharmacological composition for treating colpopathy and vaginitis. The bacterial group includes species of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus salivarius* subs. *Salivarius*. The bacterial group comprises these species mixed with one or more species selected from *Lactobacillus salivarius* subs. *Salivarius*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus minutus* and *Lactobacillus gasseri*.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-322621

(43) 公開日 平成11年(1999)11月24日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	F I	
A 6 1 K 35/74		A 6 1 K 35/74	A
31/00	6 1 5	31/00	6 1 5 B
	6 3 1		6 3 1 C

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平10-352873	(71) 出願人	598170981 レナータ・マリア・アンナ・キャバリエー ル・ベド・ベセリー Renata Maria Anna C AVARIERE Ved. VESEL Y イタリア国、20123 ミラノ (エムアイ)、 ピア・エス・オルソーラ、11
(22) 出願日	平成10年(1998)12月11日	(71) 出願人	597032479 クラウディオ・デ・シモーネ イタリア国、アルデア (ローマ)、ピア・ ヌオロ 10
(31) 優先権主張番号	9 8 8 3 0 2 6 4 . 2	(74) 代理人	弁理士 鈴江 武彦 (外 4 名)
(32) 優先日	1998年 4 月 30 日		最終頁に続く
(33) 優先権主張国	イタリア (I T)		

(54) 【発明の名称】 乳酸杆菌属の菌類を含有する膣感染症を治療するための薬学的組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【解決手段】 膣疾患および膣炎を治療する薬学的組成物を製造するためのラクトバチルス属菌類の群叢の使用。前記の細菌群叢には、ラクトバチルス・ブレヴィスおよびラクトバチルス・サリヴァリウス・サリチニウス亜種の種が含まれ、或いはこれらは、ラクトバチルス・サリヴァリウス・サリヴァリウス亜種、ラクトバチルス・ジェンセンイ、ラクトバチルス・カテナホルメ、ラクトバチルス・ミヌツスおよびラクトバチルス・ガスセリから選択された 1 以上の種と配合されて含まれる。

【効果】 上記ラクトバチルス属菌類の群叢を含有する薬学的組成物は、膣疾患および膣炎の治療に有効である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 乳酸杆菌属の種であるラクトバシルス・ブレヴィスおよびラクトバシルス・サリヴァリウス・サリチニウス亜種の群叢の使用であって、経腔投与で使用する事により膣炎および膣疾患を治療する薬学的組成物を調製するための使用。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の使用であって、前記乳酸杆菌属の菌類の群叢が、ラクトバシルス・サリヴァリウス・サリヴァリウス亜種、ラクトバシルス・ジェンセニイ、ラクトバシルス・カタナホルメ、ラクトバシルス・ミヌツスおよびラクトバシルス・ガスセリから選択される乳酸杆菌属の 1 以上の種を含有する使用。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の使用であって、前記乳酸杆菌属の菌類の群叢が、ラクトバシルス・ブレヴィス、ラクトバシルス・サリヴァリウス・サリチニウス亜種およびラクトバシルス・ガスセリの種を含んでなる使用。

【請求項 4】 請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記乳酸杆菌属の菌類の群叢が 10^7 乃至 10^{13} CFU/g の濃度で使用される使用。

【請求項 5】 請求項 1 乃至 4 の何れか 1 項に記載の使用であって、前記薬学的組成物が、液体形態、乳剤若しくは軟膏形態、または腔座剤若しくは腔用錠剤のような固体形態で製造される使用。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の使用であって、前記薬学的組成物が、その両層がともに通常の賦活剤および添加剤と配合した前記の種の乳酸杆菌類を含有する少なくとも 2 層を具備した錠剤形態で製造され、且つそれにより最外部層の細菌放出速度が、最内部層の細菌放出速度よりも大きい組成物である使用。

【請求項 7】 経腔投与に使用して膣感染を治療するための薬学的組成物であって、乳酸杆菌属の種であるラクトバシルス・ブレヴィスおよびラクトバシルス・サリヴァリウス・サリチニウス亜種の群叢を含有する薬学的組成物。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の組成物であって、前記の乳酸杆菌類の群叢が更に、ラクトバシルス・サリヴァリウス・サリヴァリウス亜種、ラクトバシルス・ジェンセニイ、ラクトバシルス・カタナホルメ、ラクトバシルス・ミヌツスおよびラクトバシルス・ガスセリから選択される乳酸杆菌属の種の 1 以上を含有する組成物。

【請求項 9】 請求項 7 に記載の組成物であって、前記乳酸杆菌類の群叢が、ラクトバシルス・ブレヴィス、ラクトバシルス・サリヴァリウス・サリチニウス亜種およびラクトバシルス・ガスセリの種を含んでなる組成物。

【請求項 10】 請求項 7 乃至 9 の何れか 1 項に記載の組成物であって、前記乳酸杆菌類の群叢が、 10^7 乃至 10^{13} CFU/g の濃度で使用される組成物。

【請求項 11】 液体形態、乳剤若しくは軟膏形態、または腔座剤若しくは腔用錠剤のような固体形態を有す

る、請求項 7 乃至 10 の何れか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】 請求項 11 に記載の組成物であって、前記組成物が、その両層がともに通常の賦形剤および添加剤と配合された前記の種の乳酸杆菌類を含有する少なくとも 2 層を具備する錠剤形態で製造され、且つそれにより最外部層の細菌放出速度が、最内部層の細菌放出速度よりも大きい組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、乳酸杆菌属菌類(1 actobacilli)の特定の種を、膣感染症を治療する薬学的組成物を製造するために使用すること、並びにこうして製造された該薬学的組成物を使用することに関する。

【0002】

【従来の技術】正常な膣および子宮頸には、胃腸系の細菌に同化可能な種々の細菌が寄生する。これらの細菌は、多くの場合、淋菌感染以外による女性生殖器系の感染症[例えば、陰門膣性膿瘍およびバルトリン腺膿瘍(または大前庭腺膿瘍)、子宮内膜炎、卵管炎、卵巢膿瘍および骨盤腹膜炎等]に関与している。

【0003】多くの場合、性病性疾患以外の炎症性骨盤疾患の進行には、嫌気性微生物と好気微生物との混合物が観察される；前述の細菌の分布域は、婦人科学的外科手術、出産、流産の後における感染が原因となる可能性があり、且つ精子侵入を予防するための子宮内装置(IUD)の使用との相関関係が存在する。

【0004】細菌性膣炎は、バクテロイデス属(Bacteroides)、ペプトストレプトコッカス属(Peptostreptococcus)、ペプトコッカス属(Peptococcus)、モビルンクス・G.バギナリス(Mobiluncus G. vaginalis)を初めとする多数の嫌気性細菌が、乳酸杆菌属の菌類に代わって膣領域に置換されたことに起因する細菌類の相互作用の結果、発症する。この症候群では顕著な刺激性分泌は見られないが、悪臭が特徴である。軽度の掻痒を生じ、性交疼痛は非常に希である。細菌性膣炎は、膣性の障害を有する女性において一般的に診断されるが、細菌性膣炎の診断基準に当てはまる女性の 50% は無症候性である。細菌性膣炎は性的行動に関連し、性交相手の数が増加すると共にその発症が増加する；しかしながら、本疾患が性感染症であるとは見なされていない。

【0005】細菌性膣炎は若干面倒な疾患であるが、生殖器系の感染(特に妊娠期間における感染)はより重篤な感染に発展する可能性を孕んでいる。

【0006】次の 4 つのうちの 3 症状に当てはまる場合には、細菌性膣炎と診断される：

(1) 膣壁に粘着する均一性の非炎症性膣分泌物；

(2) pH 4.5 以上の膣流体；

(3) 指標細胞；および

(4) 10% 水酸化カリウムの添加前または添加後の膣分泌物の催吐性の臭い(ホイフス試験；Whiff's test)。

一方で、膣炎は、異常膣分泌、局所性炎症および外陰部掻痒を特徴とする。上記の症状は、膣トリコモナス (*T. vaginalis*) またはカンジダ属 (*Candida*; 上記の全ての *Candida albicans*) の局所感染により現われる。膣疾患および症候性膣炎は、糖尿病、上皮小体不全、宿主生物の異常防御、コルチコステロイド療法、広域抗生薬、ベクトル性抗生物質療法、経口避妊薬および妊娠薬に付随する。掻痒および分泌物は、カンジダ属による膣炎の主要な症状である。時には性交疼痛が現れる。外陰部紅班および陰門膣窩口瘡が認められる。如何なる支障もなく、女性の膣がカンジダ属に感染することは日常的なことであるので、カンジダ属を原因とする膣炎の診断には局所症状の所見が必要となる。

【0007】近年における研究の結果は、乳酸杆菌属菌類が、膣等の動的生態系における正常な細菌均衡を維持し、且つ病原性微生物による生殖器感染から該生態系を守るために重要な役割を果たしている、という認識の普及に貢献している。

【0008】多数の乳酸杆菌属の菌類が健康な成人女性の膣に内在することはよく知られている。乳酸杆菌属は、膣粘膜から分泌されるグリコーゲンをエネルギー源として利用することで繁殖し、且つ後方からの病原体と競合して他の細菌による攻撃から膣腔を防御する。上述の疾患(例えば、非特異的膣炎、膣疾患および外陰部掻痒等)の治療には、主にスルホンアミド類、抗生物質および抗菌剤が使用される。とりわけ、近年における多数の抗生物質の開発に伴い、患者への抗生物質製剤の投与は頻繁なものとなった。これらの抗生物質類の投与は膣に内在する乳酸杆菌属を死に至らせる。不運にも、病原性細菌(例えば、ブドウ球菌属; *Staphylococcus*)は抗生物質類に対する耐性を獲得するため、抗生物質投与によりこれらの疾患を治療することは困難化してしまった。

【0009】特許 US-A-5176911 は、婦人科学分野における膣感染症の治療に乳酸杆菌属を使用することを提案している。

【0010】この文書は、以下の細菌類: ラクトバシルス・カセイ (カセイ菌; *Lactobacillus casei*)、ラクトバシルス・ガスセリ (*Lactobacillus gasseri*)、ラクトバシルス・フェルミンツム (発酵乳酸杆菌; *Lactobacillus fermentum*)、ラクトバシルス・カセイ・シュードプランタルム亜種 (*Lactobacillus casei* subs. *pseudoplanarum*) およびラクトバシルス・クリスパツス (*Lactobacillus crispatus*): について言及し、 10^3 から 10^{10} CFU/g、好ましくは約 10^6 CFU/g の細菌濃度を示唆している。

【0011】しかしながら、この文書において例示される全組成物は、ラクトバシルス・カセイおよび/またはラクトバシルス・フェルミンツム (*Lactobacillus fermentum*) を必須成分として、 1×10^6 CFU/g の濃度で含んで

いる。従ってこの文書は、事実上、ラクトバシルス・カセイおよび/またはラクトバシルス・フェルミンツムが、膣感染を治療する薬学的組成物を製造するための必須成分であることと、これらの組成物が、細菌濃度で 1×10^6 CFU/g (略語「CFU」は「コロニー形成単位」を意味する) で有効であることを教示するものである。

【0012】膣座薬または膣に使用するための錠剤形態で製造され、且つ乳酸杆菌属を含有する公知技術の薬学的組成物は、膣における集落形成を回復する程の十分な効果を有するには至らなかった。更に、該細菌細胞の多くの部分は、膣座薬を製造する時点で受ける物理的衝撃により死に至り、更にその数は膣腔内に拡散する時点および増殖が開始されるべき時点で減少してしまう、ことについても特記しておく。

【0013】従って、適切な種の乳酸杆菌属の菌類またはその混合物、およびそれらを含有する薬学的組成物 (公知技術の組成物のような欠点はない) を処置することが必要である。

【0014】特に、患者への投与により確かな有効性を得られるような非常に優れた品質を有する、膣に使用するための薬学的組成物が必要である。

【0015】加えて、該薬学的組成物の態様は、乳酸杆菌属が安定して増殖できる数を維持する能力を有し、且つ前記乳酸杆菌属が膣腔内で拡散する間に合って、この乳酸杆菌属の持続的に安定した活性を確保できる能力を有していなくてはならない。

【0016】本出願人らは、乳酸杆菌属の菌類を基礎にした薬学的組成物が、以下の性質を可能な限り高度に満足する場合に限り、膣感染を治療する非常に優れた効果を提供できることを見出した:

(a) 選択された乳酸杆菌属菌株は、膣上皮に対する高親和性 (即ち、膣の上皮細胞に接着する高い能力) を有していなくてはならない。この性質により、生理的および病理的条件の両方における膣粘膜に対する細菌の相互作用が可能になり (これにより、上皮の受容部位における病原性微生物との競合的活性が示される)、並びに微生物叢および最適な pH 条件の回復が可能になる;

(b) 選択された乳酸杆菌属菌株の少なくとも 1 が、該病原性微生物に向けた阻害活性を示す過酸化水素を産生する高い能力を有していなくてはならない; および

(c) 選択された乳酸杆菌属菌株の少なくとも 1 が、HeLa 細胞へのカンジダ・アルビカンスの接着を競合的に阻害する高い能力により特徴付けられていなくてはならない。

【0017】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、上記の性質を可能な限り高度に満足し、それ故に、その使用が膣感染症 (例えば膣炎および膣疾患等) の効果的な治療に適切な乳酸杆菌属菌類を基礎にした薬学的組成物を提供することである。この点に関し、本出願人

らは、他種の乳酸杆菌属菌類よりも、乳酸杆菌属の種であるラクトバシルス・ブレヴィスおよびラクトバシルス・サリヴァリウス・サリチニウス亜種が、上記の3性質の全てを非常に高度に満足していることを見出した。

【0018】本発明のもう一つの目的は、乳酸杆菌属菌類を含有する腔投与に適応した薬学的組成物であって；液体組成物、乳剤または軟膏形態の組成物、並びに詳しくは腔座剤および錠剤形態である固体組成物；の形態で製造された薬学的組成物を提供することである。

【0019】本発明の更なる目的は、その中に含有され、時間的に差別化された様式で、乳酸杆菌類を放出することが可能な固体の薬学的組成物を提供することである。

【0020】

【課題を解決するための手段】前記の目的および更なる本発明の目的（以下の詳細な説明が進むに連れて明らかになるであろう）は、本発明によって達成されるが、その第一の側面は、本発明の目的が、経腔投与で用いられる腔感染（例えば、腔炎および腔疾患等）を治療する薬学的組成物を製造するための、乳酸杆菌属の種であるラクトバシルス・ブレヴィスおよびラクトバシルス・サリヴァリウス・サリチニウス亜種の群叢の使用を提供することである。

【0021】もう一つの側面において、本発明の目的は、前記薬学的組成物を提供することである。

【0022】

【発明の実施の形態】本発明の詳細な態様において、ラクトバシルス・ブレヴィスおよびラクトバシルス・サリヴァリウス・サリチニウス亜種の種の細菌類を、ラクトバシルス・サリヴァリウス・サリヴァリウス亜種 (*Lactobacillus salivarius* subs. *salivarius*)、ラクトバシルス・ジェンセニイ (*Lactobacillus jensenii*)、ラクトバシルス・カテナホルメ (*Lactobacillus cateniformis*)、ラクトバシルス・ミヌツス (*Lactobacillus minutus*) およびラクトバシルス・ガスセリ (*Lactobacillus gasseri*) から選択された乳酸杆菌属の 1 以上の種との配合物中で使用することが可能である。

【0023】好ましくは、本発明の薬学的組成物中に使用される細菌類の群叢は、ラクトバシルス・ブレヴィス、ラクトバシルス・サリヴァリウス・サリチニウス亜種およびラクトバシルス・ガスセリを含有し、またはこれらからなる。

【0024】使用されるべき乳酸杆菌属の菌類を特定する例は：

ーラクトバシルス・ブレヴィス ATCC 4006 および ATCC 14869

ーラクトバシルス・サリヴァリウス・サリチニウス亜種 ATCC 11742

ーラクトバシルス・ガスセリ ATCC 9857である。

【0025】ATCC は、アメリカン・タイプ・カルチャ 50

ー・コレクション (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA) を意味する。

【0026】好ましくは、本発明に従って使用される細菌の群叢には、該細菌類が 10^7 から 10^{12} CFU/g、より好ましくは 10^8 から 10^{12} CFU/g、最も好ましくは 10^9 から 10^{12} CFU/g より高濃度となる濃度で含まれる。好ましくは前記細菌類の群叢には、各種が 10^6 から 10^{12} CFU/g の濃度で存在する。

【0027】好ましい該細菌培養物は、凍結乾燥物である。

【0028】特定使用のための本発明の薬学的組成物は、液体形態（洗浄用溶液）、乳剤若しくは軟膏形態、または固体形態（即ち、腔座剤若しくは腔用錠剤、パケット等）に製造される。錠剤形態に製造された薬学的組成物は、1 層または差別化された放出時間を有する 2 以上の層の錠剤とすることが可能である。

【0029】特に、本発明の薬学的組成物は、両層ともに通常の賦形剤および添加剤と配合した前記種の乳酸杆菌類を含んだ少なくとも 2 層を具備し、従って最外部層の細菌放出速度が、最内部層の細菌放出速度よりも大きい錠剤形態で製造できる。

【0030】例えば、本発明の該薬学的組成物は、2 層に製造された錠剤形態で製造することが可能である。前述の 2 層は、外側層の細菌が 10-25 分（例えば、15-20 分）が経過する間に放出され、それに対して内側層の細菌は、外側層に続いて 25-50 分（例えば、30-40 分）が経過する間に放出される、といったように製造することが可能である。

【0031】本発明の好ましい態様において、該薬学的組成物は、また、投与後の数時間の間、腔内 pH を 3 と 5.5 間に含まれるように安定化し維持することが可能な緩衝剤も含む。該緩衝剤は、例えば、硼酸、乳酸、アルコールビン酸、クエン酸若しくは酢酸等の薬学的に許容され得る無機若しくは有機の弱酸の何れかから選択された弱酸を、各々のナトリウム塩と配合して、または使用された弱酸と塩基の共役した別の薬学的に許容される塩と配合して含有する緩衝系である。好ましくは、該 pH は 4.2 から 4.5 の間に緩衝化され、好ましくは緩衝剤として使用される緩衝系は：乳酸および乳酸ナトリウム、またはアスコルビン酸およびアスコルビン酸ナトリウムにより製作される。

【0032】更に、本発明の製剤に含むことが可能な構成要素または成分は、香味剤、メントール、ユーカリノキ属の精油、一般的な清涼剤として使用されるメチルサリチレート若しくはサリチレート、ヒドロコルチゾン若しくは他の抗炎症性ステロイド類（0.01 から 500 mg/g）、抗炎症剤、抗生物質、および加湿剤（EDTA、ドデカエチレングリコールモノラウレート等）、エストリオール（0.001 から 1 mg/g）および／または他のホルモン物質またはホルモン様活性を示す物質、トウモロコシ

デンプン若しくはジャガイモデンプン、ビタミン類、抗酸化剤、酵素類（ヒアルロニダーゼ）、ヘパリノイド類、リコダイン（lycodaine）および他の局所麻酔薬、植物抽出物（ペラドンナ）、亜鉛、カルシウムおよびビスマスである。洗浄用および灌注用の水剤類の調製には小瓶類を使用し、これには凍結乾燥した微生物（使用前に該小瓶中に別けて含有された適切な液体培地に溶解しなくてはならない）を含有するリザーバーを備え付ける。本発明の組成物は、事実上、如何なる毒性も有さず、且つ如何なる全身性の吸収も生じないので、妊娠中の患者への投与も、並びに抗生物質および抗細菌性薬剤に対してアレルギーを有する患者への投与も可能である。

【0033】従来の獲得された臨床上の経験に従い、錠剤、乳剤および懸濁剤の形態にした本発明の該組成物を就寝前に投与することと、続いて翌朝に洗浄剤により洗浄することとを具備する治療スケジュールが、特に適切且つ効果的であると考えられる。

【0034】本発明を一般化して記述してきたが、同様に本発明は、以下に挙げる幾つかの特定の例を引用することにより更に深く理解されるであろう。また、これらの例は説明の目的で記述したものであり、本発明を何ら制限するものではない。

【0035】

【実施例】【例1】 乳酸杆菌類の HeLa 細胞への接着本試験により、HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌に由来する細胞系）に対する乳酸杆菌属の異なる菌株〔アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）から〕の接着能力が試験された。HeLa 細胞は、組織培養用ボトルの 10%（v/v）胎児ウシ血清（FBS）を添加した MEM（最小必須培地：Minimal Essential Medium）中で、単層として維持した。接着反応は、多ウェル培養プレート上で、各ウエ

ルセル内に滅菌済みカバーガラス（24x24mm）を含む組織を用いて実施した。各ウェルには、1ml の HeLa 細胞懸濁液を 1.2×10^5 cells/ml の濃度で播種し、該プレートを 24 時間、37°C、5% CO₂ 雰囲気下にてインキュベートした。接着試験の前に、全ての細菌株を MES・ブロス・サブカルチャー（Difco）中に置いた。嫌気性条件下（15% CO₂）にて 24 時間、37°C でインキュベーションした後、該細菌を新しいブロス内において「耐性化（strengthened）」し、続いて同様の試験条件において一晚インキュベーションした。嫌気性環境は、「アンアエロゲン（anaerogen）」（Oxoid）と称する特殊なバッグを入れたジャーの中で該細菌をインキュベートすることにより得た。接着試験では、異なる希釈濃度で MEM 中に懸濁した細菌の希釈物を、単層の細胞の上で、37°C、マクロ好気性条件下において、1 時間、インキュベートした。PBS で数回、洗浄し、接着していない微生物を除去した後、該細胞は、1 ウェル当たり 0.4ml のメイ-グリュンヴァルト染料で 4 分間、処理し、水で希釈したギムザ染色液で 15 分間洗浄し、その後、光学顕微鏡により試験した。処理濃度は、接着する細菌を有する細胞のパーセンテージと、細菌/細胞の数を基に選択した。最大接着は、 5×10^5 細菌/ml の濃度で得られた。

【0036】得られた結果を表 1 に示した。これにより、試験した乳酸杆菌類は HeLa 細胞に対する接着能力を有し、夫々が該宿主細胞に対して異なる接着度を有していることが示された。ラクトバシルス・ブレヴィスおよびラクトバシルス・サリバリウス・サリチニウス亜種の種において、最高接着度が得られた。加えて、ラクトバシルス・カセイの接着度は低く、侵襲性を示したことから、本発明の薬学的組成物の製造には適切でないことが明らかとなった。

【0037】

表 1 HeLa 細胞に対する異なる乳酸杆菌属菌株の接着
乳酸杆菌類

乳酸杆菌類	細菌接着		
	接着した細菌数/細胞	細菌が接着している細胞の割合 (%)	侵襲性 (a)
A) L. リグネリス・リチニウス 亜種 (ATCC 11742)	15	60	—
B) L. ブレヴィス (ATCC 4006)	35	100	—
C) L. ブレヴィス (ATCC 14869)	35	100	—
D) L. クリスナス (ATCC 33197)	10	45	+ / —
E) L. ガスリ (ATCC 9857)	5	16	—
F) L. カセリ (ATCC 8530)	8	19	+

【0038】量的な細菌接着を、細菌接着を伴った任意に選択した 300 の細胞のパーセンテージと、細胞当たりに接着する細菌数の平均値とにより示した。

【0039】

(a) += 侵襲性; +/- = 若干侵襲性; - = 非侵襲性。

【0040】【例2】 乳酸杆菌類の抗カンジダ作用種々の乳酸杆菌属の種について、HeLa 細胞へのカンジダ・アルビカンスの接着（およびそれによるカンジダ・アルビカンスの感染）との競合的拮抗力を測定した。

【0041】乳酸杆菌類の感染を、宿主細胞に対する真菌(C.アルビカンス; C. albicans)の接着レベルで評価するために、滅菌済みカバーグラスを含む 24 ウェルプレート上に成長させた単層 HeLa 細胞を、夫々、 5×10^5 細菌/ml および 5×10^8 真菌/ml の最終濃度で PBS 中に希釈した乳酸杆菌類と C.アルビカンス(ヒト臍より*

* 単離した2つの臨床試料であり、本例においては夫々 CA2 および CA3 と称する)との 0.1ml の懸濁混合液と共にインキュベートした。37°Cでの、マクロ好気性条件下における 1 時間のインキュベーションの後、細胞を、PBS 中で 5 回洗浄し、メイ-グリュンヴァルト染料およびギムザを処理した。次に、スライドグラスを光学顕微鏡(倍率 1000x)で検査し、HeLa 細胞に接着した微生物のレベルを評価した。表 2 に示した得られた結果は、試験した乳酸杆菌類の全てが、HeLa 細胞に対する C.アルビカンスの接着を減少する能力を有することを示している。L.ブレヴィス ATCC 4006 が、最も高い阻害活性値を有し、カンジダが接着した細胞数は約 50% に減少し、且つ細菌/細胞の数が対照の数の約半分に減少した。

【0042】

(表2) C.アルビカンスの HeLa 細胞への接着の乳酸杆菌類による競合的拮

抗作用 細菌類	真菌を 伴う細胞 %	細菌を 伴う細胞 %	微生物/細胞の平均数	
			真菌	細菌
CA2	68		5	
CA3	61		7	
A) L. サリバリウス・ サリチニウス 亜種 ATCC 11742		54		10
B) L. ブレヴィス ATCC 4006		95		20
C) L. ガスセリ ATCC 9857		15		6
D) L. カセイ ATCC 8530		13		8
CA2 + A	52	55	3	10
CA3 + A	43	54	3	11
CA2 + B	44	99	3	20
CA3 + B	34	99	2	20
CA2 + C	48	15	4	6
CA3 + C	57	16	5	5
CA2 + D	61	12	5	7
CA3 + D	58	12	5	7.

【0043】本競合的拮抗試験のための乳酸杆菌類および真菌類は、夫々、最終濃度 5×10^5 /ウェルおよび 5×10^8 /ウェルで使用した。

【0044】【例3】 乳酸杆菌類による過酸化水素産生

乳酸杆菌属の 5 つの種の H_2O_2 産生能について試験した。細菌を培養するために、テトラメチルベンジジンを加えた寒天寒天プレート上に位置した。嫌気性条件下のジャー中、37°Cで 3 日、インキュベーションした後、該寒天寒天プレートを空気に暴露した。

【0045】この方法により、培養用培地中に存在するペルオキシダーゼは乳酸杆菌類により産生された H_2O_2

と反応する。続くテトラメチルベンジジンの酸化により、 H_2O_2 産生コロニーが青色に染色される。

【0046】表3に示した得られた結果は、L.サリバリウス・サリチニウス亜種 ATCC 11742 および L.ガスセリ ATCC 3857 が H_2O_2 の産生に対して陽性であったことを示している。

【0047】L.カセイ ATCC 8530 は何れの陽性も示さなかった。他の試験菌株は、何れの反応性もなかった。これらの結果は、乳酸杆菌類による H_2O_2 産生と、HeLa 細胞への C.アルビカンスの接着に対する細菌類による競合的拮抗作用との間には相互関係が存在しないことが示している。

【0048】

〈表3〉 乳酸杆菌類による過酸化水素の産生

乳酸杆菌類	H ₂ O ₂ の産生
A)ラクトバシリス・サリバリウス・サリチニウス 亜種(ATCC 11742)	+
B)ラクトバシリス・ブレヴィス(ATCC 4006)	-
C)ラクトバシリス・ブレヴィス(ATCC 14869)	-
D)ラクトバシリス・ガッセリ(ATCC 3857)	+
E)L.カセイ(ATCC 8530)	-
+ = 全細菌コロニーが青色に染色された	
+/- = 淡青色の染色あり	
- = 染色されたコロニーなし。	

【0049】好ましい薬学的組成物の幾つかの例を以下に示すが、これらは、説明を目的とするものであって、何ら制限を意図するのではない。これらの組成物は、幾つかの微生物種の群叢を含有する微生物培養凍結乾燥産物を腔内に投与するための錠剤、腔座剤、乳剤および洗浄用液剤を製造することを意図している。

【0050】《腔用錠剤の例》

〔例4〕担体と、L.ブレヴィス ATCC 4006 および L. サリヴァリウス・サリチニウス亜種 ATCC 11742 (1:1の割合)の群叢を含有する微生物培養凍結乾燥産物(1×10⁹ CFU/g)とを含有する若干の発泡性を有する急速放出性錠剤を調製するための単位組成：

微生物培養凍結乾燥産物	500 mg
乳糖	350 mg
トウモロコシデンプン	200 mg
アジピン酸	67 mg
重炭酸ナトリウム	67 mg
ステアリン酸マグネシウム	11 mg

微生物培養凍結乾燥産物	500 mg
マンニトール	560 mg
ハイドロキシプロピルメチルセルロース	80 mg
タルク	18 mg
ステアリン酸マグネシウム	19 mg
コロイド状シリカ	3 mg

【0055】該海面状材料を 270μm のメッシュに押し付けることにより、該微生物培養凍結乾燥産物を調整する；ふるいに掛けた該産物に、予め 279 μm メッシュ上でふるいに掛けたマンニトール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、タルク、ステアリン酸マグネシウムおよびコロイド状シリカを添加する。全材料を、粉末になるまで、ターブラ T2A 型ミキサー(Turbula T2A type mixer)中で 30 分間混合する。こうして得た混合物を、続いて、卵型の打錠用パンチを装備した回転圧搾機を用いた圧搾操作に供し、それにより腔用錠剤は 1200

* ステアリン酸

3 mg

コロイド状シリカ

2 mg

20 【0051】上記の組成を有する錠剤を製造するために、顆粒またはペレットの前調製が必要である。

【0052】潤滑化したペレットに、次に、前もって 300μm メッシュ上でふるいに掛けた 500.0 g の前記の微生物培養凍結乾燥産物を添加し、更に 15 分間、再度混合した。このようにして得られたペレットを、続いて、卵型の打錠用パンチを装備した回転圧搾機を用いた圧搾操作に供し、それにより腔用錠剤は 1200 mg の平均重量で得られる。

【0053】イタリア薬局方に記載の装置を用いたところ、得られた該錠剤の崩壊時間(disgregating time)は、約 15 分である。

【0054】〔例5〕担体と、例 4 と同様の微生物培養凍結乾燥産物とを含有する低速放出錠剤を製造するための単位組成：

微生物培養凍結乾燥産物	500 mg
マンニトール	560 mg
ハイドロキシプロピルメチルセルロース	80 mg
タルク	18 mg
ステアリン酸マグネシウム	19 mg
コロイド状シリカ	3 mg

mg の平均重量で得られる。

【0056】イタリア薬局方に記載の装置を用いた測定の結果、得られた該錠剤の崩壊時間(disgregating time)は、約 30 分である。

【0057】〔例6〕担体と、例 4 と同様の微生物培養凍結乾燥産物とを含有する 2 層錠(1 高速放出層と 1 低速放出層)の調製。

【0058】高速放出層(若干の発泡性を有する層)を調製するための単位組成：

微生物培養凍結乾燥産物	250 mg
-------------	--------

13

14

乳糖	240 mg	* ステアリン酸マグネシウム	6 mg
トウモロコシデンプン	41 mg	ステアリン酸	2 mg
アジピン酸	30 mg	コロイド状シリカ	1 mg
重炭酸ナトリウム	30 mg	* 【0059】	

低速放出層を調製するための単位組成：

微生物培養凍結乾燥産物	250 mg
マンニトール	280 mg
ハイドロキシプロピルメチルセルロース	50 mg
タルク	9 mg
ステアリン酸マグネシウム	10 mg
コロイド状シリカ	1 mg

【0060】高速放出層に使用するベレットは、例 4 に記載の方法に従って調製する；低速放出層に使用する混合物は、例 5 に記載の方法に従って調製する。

【0061】高速放出層の上記ベレットと、低速放出層を調製する上記混合物とを、2 層錠(マネスティ・レイヤー・プレス・タイプ；Manesty Layer Press thpe) を作製するのに適し、且つ卵型の打錠用パンチを備え付けた適切な圧搾機の 2 つの別個の充填ホッパーに投入する。

【0062】該圧搾機は、総重量が 1200 mg であり、これは夫々 600 mg の 2 層かなり、且つ各層が 250 mg の該微生物培養凍結乾燥産物を含有する 2 層錠を得られるように調整されている。得られた 2 層錠を、イタリア薬局方に記述の装置を使用した崩壊試験(disgregating test)に供し、高速放出層に関しては約 15 分、また低速放出層に関しては約 30-40 分の崩壊時間(disgregating time)を得た。

【0063】[例 7]

活性成分：1 g の例 4 と同様の微生物培養凍結乾燥産物 賦形剤：2.5 g の半合成グリセリド類およびジャガイモデンプン。

【0064】[例 8]

※

※ 腔用乳剤 (10g のチューブ)

活性成分：1 g の例 4 と同様の微生物培養凍結乾燥産物
賦形剤：水酸化ラノリン(2g)、ワセリン油(2g)、ジメチルポリシロキサン(3g)、SiO₂ (4g)。

【0065】[例 9]

リザーバーを伴った小瓶

各小瓶は以下を含む：

- a) リザーバー：2 g の例 4 と同様の微生物培養凍結乾燥産物
b) 小瓶(10ml)：グリセロール 3g および 10ml に十分な量の水。

【0066】[例 10-15] 例 4 から 9 を、前記例の夫々の条件に従う同じ方法に従って繰り返すが、唯一、微生物培養凍結乾燥産物については異なるもの、即ち、L.ブレヴィス ATCC 14869、L.サリヴァリウス・サリチニウス亜種 ATCC 11742、および L.ガスセリ ATCC 9857 の種を 1:1:1 の割合からなる微生物培養凍結乾燥産物(濃度 1×10^9 CFU/g)を使用した。

【0067】例 4 から 15 において得られた全ての薬学的製剤が腔炎および腔疾患に罹患する患者の治療において非常に有効であることは、既に証明されている。

フロントページの続き

(72)発明者 レナータ・マリア・アンナ・キャバリエール・ベド・ベセリー
イタリア国、20123 ミラノ(エムアイ)、
ピア・エス・オルソーラ、11

(72)発明者 クラウディオ・デ・シモーネ
イタリア国、00040 アルデア(ローマ)、
ピア・ヌオーロ、10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)